



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets 7 :		(11) Numéro de publication internationale: WO 00/30587	
A61K		(43) Date de publication internationale: 2 juin 2000 (02.06.00)	
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR99/02897		(81) États désignés: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BO, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GR, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LR, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, brevet ARIPO (GH, OM, KE, SZ, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet européen (AT, BE, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IL, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
(22) Date de dépôt international: 24 novembre 1999 (24.11.99)		Publié Sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport.	
(30) Données relatives à la priorité: 98/14838 23 novembre 1998 (25.11.98) FR			
(71) Déposant (pour tous les États désignés) et/ou US/FR: CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (FR/FR); 3, rue Michel-Auge, F-75794 Paris Cedex 16 (FR).			
(72) Inventeurs: et (73) Invention/Matériau (US seulement): IIRSCIL, François (FR/FR); 20, rue Victor Camille, F-94110 Arcueil (FR); IIAEFFNER, Astrid (FR/FR); 14, avenue de Celles, F-92160 Meudon la Forêt (FR).			
(74) Mandataires: DEMACHY, Charles et.; Grosset-Fournier & Demachy, 20, rue de Maubeuge, F-75009 Paris (FR).			

(54) Title: NF- κ B ACTIVATION INHIBITORS, AND THEIR PHARMACEUTICAL USES

(55) Title: INHIBITEURS DE L'ACTIVATION DE NF- κ B, ET LEURS UTILISATIONS PHARMACEUTIQUES

(57) Abstract

The invention concerns the use of the nuclear factor NF- κ B inhibitors for treating cancer, and more particularly malignant haemopathy and solid tumours, as well as product containing a NF- κ B activation inhibitor compound and a cytotoxic molecule capable of activating the NF- κ B factor as a combined preparation for simultaneous, separate or prolonged use for treating said pathologies.

(57) Abrégé

La présente invention a pour objet l'utilisation d'inhibiteurs du facteur nucléaire NF- κ B, dans le cadre du traitement de cancers, et plus particulièrement d'hémopathies malignes ou de tumeurs solides, ainsi que les produits contenant un composé inhibiteur de l'activation de NF- κ B et une molécule cytotoxique susceptible d'activer le facteur NF- κ B, en tant que préparation de combinaison pour une utilisation simultanée, séparée, ou étalée dans le temps pour le traitement desdites pathologies.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les États parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LI	Liechtenstein	SI	Slovaquie
AM	Arménie	FI	Finlande	LU	Luxembourg	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LV	Lettonie	SN	Sénégal
AU	Australie	GB	Grande-Bretagne	MC	Monaco	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GR	Grèce	MD	République de Moldova	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GU	Guam	MG	Madagascar	TG	Togo
BB	Barbade	HN	Honduras	MK	Macédoine du Nord	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	HU	Hongrie	ML	Mali	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	IE	Irlande	MR	Mauritanie	TR	Turquie
BG	Bulgarie	IS	Islande	MW	Malawi	TT	Trinité-et-Tobago
BI	Burundi	IT	Italie	MX	Mexique	UA	Ukraine
BJ	Bénin	JP	Japon	NE	Niger	UG	Ouganda
BM	Bermudes	KE	Kenya	NI	Nicaragua	US	Etats-Unis d'Amérique
BN	Brunei	KG	Kirghizistan	NO	Norvège	UZ	Ouzbékistan
BO	Bolivie	KH	Kampuchie	PY	Paraguay	VN	Viet Nam
BR	Brésil	KR	Corée du Sud	RU	Russie	YU	Yougoslavie
BS	Bahamas	KZ	Kazakhstan	SD	Soudan	ZW	Zimbabwe
BT	Butan	LA	Laos	SR	Suriname		
BV	Bermudes	LR	Libéria	SG	Singapour		
CA	Canada						
CF	République centrafricaine						
CG	Congo						
CH	Suisse						
CI	Côte d'Ivoire						
CN	Chine						
CO	Colombie						
CU	Cuba						
CZ	République tchèque						
DE	Allemagne						
DK	Danemark						
EE	Estonie						

INHIBITEURS DE L'ACTIVATION DE NF- κ B, ET LEURS UTILISATIONS PHARMACEUTIQUES

5 La présente invention a pour objet l'utilisation d'inhibiteurs biologiques de NF- κ B, dans le cadre du traitement de cancers, et plus particulièrement d'hémopathies malignes ou de tumeurs solides.

10 De nombreuses cellules tumorales ont développé des mécanismes sophistiqués leur permettant de résister à l'effet de certains agents utilisés en chimiothérapie anticancéreuse. Une des parades actuelles développées par les cliniciens est l'augmentation du dosage de ces médicaments, avec pour conséquence une aggravation des effets secondaires observés chez les patients. Ainsi par exemple, la plupart des leucémies et certains lymphomes sont traités par l'administration d'anthracyclines (daunomycine, dautxorubicine) dont la toxicité se manifeste sur des fonctions vitales (hépatique, cardiaque...)

15 (Gauthier, PH, 1987, Gaz Med Fr, 94:43-49). Le mécanisme d'action de ces médicaments a été bien étudié et aboutit essentiellement à la mort des cellules tumorales par apoptose (Hamun YA, Blood, 89:1845-1853). Pour échapper à l'apoptose, les cellules utilisent une catégorie de protéines codées par des gènes dénommés *multidrug resistant genes* (MDR) qui leur permettent de contrôler l'entrée ou la sortie de différentes molécules (Pastan I, Gottesman MM, 1991, Annu Rev Med, 42:277-286). Dans le cas des agents anticancéreux, ceux-ci sont évacués activement par l'intermédiaire de la P-glycoprotéine (P-gp), produit du gène *MDR1*.

20 Comme tout gène, l'expression des *MDR* est contrôlée par différents facteurs nucléaires. Ainsi, il a été récemment montré que le gène *MDR1* possédait dans sa partie régulatrice des sites de fixation du facteur NF- κ B (Zhou G, Kuo MT, 1997, J Biol Chem, 272:15174-15183). Ce facteur nucléaire, qui par ailleurs joue un rôle considérable dans de nombreuses situations inflammatoires (Barnes PJ, Karin M, 1997, N Engl J Med, 336:1066-1071) participerait à l'activation du gène *MDR1*.

25 Plusieurs travaux récents ont établi un lien entre l'inhibition de l'activation de NF- κ B et la potentialisation de l'apoptose. Dans les premières expériences rapportées (Wang CY et coll., 1996, Science, 272:784-786, Van Antwerp DJ et coll., 1996, Science, 272:787-789) les auteurs ont validé leurs données en utilisant des lignées manipulées génétiquement pour obtenir l'inhibition ou la

surexpression de l'activité NF- κ B. Ceci ne permet donc pas d'en tirer directement des applications thérapeutiques.

3 Dans une autre étude, les auteurs ont testé les effets de différents inhibiteurs de protéases empêchant l'activation de NF- κ B (pyrrolidine dithiocarbamate, N-tosyl-L-lysyl chloromethylcétone, N-acétyl cystéine) sur une lignée de macrophages murins (Mannick EE et coll., 1997, Mediators of Inflammation, 6:225-232). Les auteurs de cet article concluent sur le lien possible entre l'inhibition de NF- κ B et l'induction de l'apoptose des cellules inflammatoires et immunes.

10 Enfin, une autre approche axée sur l'inhibition des effets inflammatoires de NF- κ B, a consisté à surexprimer l'inhibiteur naturel de NF- κ B, la molécule I κ B, par thérapie génique (Makarov SS et coll., 1997, Gene Ther, 4:846-852). Cette technologie est encore au stade de développement du fait de la complexité de la vectorisation nécessaire à son bon fonctionnement.

15 La présente invention découle de la mise en évidence par les Inventeurs de nouveaux effets de l'hormone de croissance humaine (hGH), dénommée également somatotropine, à savoir d'une part que l'hGH, et autres composés se liant spécifiquement aux récepteurs transmembranaires des cytokines de classe I, sont des inhibiteurs de l'activation de NF- κ B par une molécule cytotoxique, et, d'autre part que l'hGH, et autres composés susmentionnés, permettent de potentialiser les effets de molécules cytotoxiques et donc de réduire les concentrations de ces dernières dans le cadre de traitements thérapeutiques.

20 Tout d'abord, les Inventeurs ont observé que les monocytes humains répondaient moins à une stimulation par les lipopolysaccharides (LPS) quand ils étaient cultivés en présence d'hGH recombinante exogène. Les Inventeurs en ont conclu que l'hGH inhibait l'activation de NF- κ B après stimulation par les LPS (Haefliger A et coll., 1997, J Immunol, 158:1310-1314).

25 Puis, les Inventeurs ont mis en évidence que les monocytes humains mouraient après le pontage (ou l'engagement) de la molécule de surface APO1/CD95/Fas, et ont montré que l'hGH diminue la mort médiée à travers la molécule Fas, en augmentant la synthèse d'un proto-oncogène antiapoptogène, Bcl-2.

30 Enfin, les Inventeurs ont étudié les effets de l'hGH sur la réponse au TNF- α car Fas et le récepteur p55 du TNF- α appartiennent à la même famille des récepteurs de croissance nerveuse. La lignée leucémique promyéloïde humaine U937 a été utilisée pour réaliser ce travail, du fait de l'insensibilité des monocytes humains à la mort médiée par le TNF- α . L'obtention de résultats

inverses à ceux observés avec Fas, à savoir que l'hGH accélère la mort des cellules médiée par le TNF- α , a permis aux Inventeurs de conclure sur l'effet inhibiteur de l'hGH sur l'activation de NF- κ B par le TNF- α ou par d'autres molécules cytotoxiques activant NF- κ B, telle que la daunomycine.

Ainsi, la présente invention a pour but de fournir une nouvelle méthode de traitement des cancers, et plus particulièrement des hémopathies malignes et des tumeurs solides, offrant l'avantage d'améliorer à la fois la réponse des malades à certains traitements anticancéreux et également, potentiellement, l'état général du malade.

L'invention a également pour but de fournir de nouveaux produits destinés au traitement desdites pathologies, présentant à la fois l'avantage d'augmenter la réponse des cellules tumorales à la chimiothérapie, et celui d'améliorer l'état général des patients. Les nouveaux produits de l'invention permettent de diminuer l'activation du facteur NF- κ B par l'intermédiaire du composé inhibiteur de l'activation de NF- κ B utilisé, tel que l'hormone de croissance humaine, ce qui est susceptible d'entraîner l'inhibition de la transcription des gènes *MDR* et donc un renforcement des effets cytotoxiques des agents antitumoraux utilisés, avec pour conséquence attendue la diminution du dosage de ces médicaments antitumoraux.

L'invention a pour objet l'utilisation de composés inhibiteurs de l'activation de NF- κ B, pour la préparation de médicaments destinés au traitement des hémopathies malignes et des tumeurs solides.

L'invention a plus particulièrement pour objet l'utilisation de composés inhibiteurs de NF- κ B, pour la préparation de médicaments destinés à la prévention de l'apparition, ou au traitement, de phénomènes de résistance aux molécules cytotoxiques utilisées dans le cadre du traitement des pathologies susmentionnées, ces phénomènes de résistance apparaissant chez les patients traités par ces molécules lorsque ces dernières sont susceptibles d'activer NF- κ B.

Par composés inhibiteurs de l'activation de NF- κ B (encore désignés composés inhibiteurs de NF- κ B), on entend tout composé capable d'inhiber dans les cellules de l'organisme, l'activation de NF- κ B faite par des molécules cytotoxiques utilisées dans le cadre du traitement des pathologies susmentionnées, et donc tout composé capable d'inhiber la synthèse de protéines (telle que la P-gp) permettant aux cellules d'évacuer ces molécules avant qu'elles n'aient pu atteindre leurs cibles moléculaires.

L'invention concerne plus particulièrement l'utilisation susmentionnée de composés inhibiteurs de l'activation de NF- κ B, en association avec une ou plusieurs molécules cytotoxiques utilisables dans le cadre du traitement des hémopathies malignes ou des tumeurs solides, lesdites molécules cytotoxiques étant susceptibles d'activer le facteur NF- κ B.

Avantageusement, les composés inhibiteurs de l'activation de NF- κ B utilisés dans le cadre de la présente invention, sont des composés se liant spécifiquement aux récepteurs transmembranaires des cytokines de classe I dans les cellules de l'organisme. De préférence, lesdits composés sont choisis parmi ceux se liant aux récepteurs susmentionnés dont les séquences en acides aminés des parties transmembranaires, intracytoplasmiques et extramembranaires présentent une homologie d'environ 50 % à environ 70 %.

L'invention a plus particulièrement pour objet l'utilisation susmentionnée de composés inhibiteurs de l'activation de NF- κ B tels que définis ci-dessus, choisis parmi l'hormone de croissance, la prolactine, l'érythropoïétine, l'interleukine-4, l'interleukine-7, le G-CSF, le GM-CSF, l'interleukine-3, l'interleukine-6, d'origine humaine ou autres mammifères.

De préférence, lesdits composés sont choisis parmi l'hormone de croissance, ou l'érythropoïétine.

A ce titre l'invention a plus particulièrement pour objet l'utilisation susmentionnée :

- de l'hormone de croissance humaine, telle qu'obtenue par extraction à partir d'extraits hypophysaires, et purification,
- ou, avantageusement, de l'hormone de croissance humaine recombinante telle que codée par la séquence nucléotidique SEQ ID NO 1, ou par toute séquence nucléotidique dérivée de cette dernière par dégénérescence du code génétique et étant néanmoins capable de coder pour l'hormone de croissance humaine dont la séquence en acides aminés est représentée par SEQ ID NO 2, ladite hormone de croissance étant obtenue par transformation de cellules appropriées à l'aide de vecteurs contenant une séquence nucléotidique telle que décrite ci-dessus, récupération de la protéine recombinante produite par lesdites cellules, et purification.

L'invention concerne également l'utilisation susmentionnée, de toute séquence peptidique dérivée par addition et/ou suppression et/ou substitution d'un ou plusieurs acides aminés de la séquence SEQ ID NO 2, et conservant la propriété de l'hormone de croissance humaine d'inhiber l'activation de NF- κ B.

L'invention a plus particulièrement pour objet encore l'utilisation susmentionnée de l'érythropoïétine humaine recombinante telle que codée par la séquence nucléotidique SEQ ID NO 3, ou par toute séquence nucléotidique dérivée de cette dernière par dégénérescence du code génétique et étant néanmoins capable de coder pour l'érythropoïétine humaine dont la séquence en acides aminés est représentée par SEQ ID NO 4, ladite érythropoïétine étant obtenue par transformation de cellules appropriées à l'aide de vecteurs contenant une séquence nucléotidique telle que décrite ci-dessus, récupération de la protéine recombinante produite par lesdites cellules, et purification...

L'invention concerne également l'utilisation susmentionnée, de toute séquence peptidique dérivée par addition et/ou suppression et/ou substitution d'un ou plusieurs acides aminés de la séquence SEQ ID NO 4, et conservant la propriété de l'érythropoïétine humaine d'inhiber l'activation de NF- κ B.

L'invention a plus particulièrement pour objet l'utilisation susmentionnée de composés inhibiteurs de l'activation de NF- κ B tels que définis ci-dessus, pour la préparation d'un médicament administrable par voie parentérale (IM, IV, SC), notamment à raison :

- d'environ 2 UI/kg de poids corporel/jour dans le cas de l'hormone de croissance humaine,
- d'environ 150 UI/kg de poids corporel/jour dans le cas de l'érythropoïétine humaine.

Parmi les molécules cytotoxiques susceptibles d'activer le facteur NF- κ B utilisées en association avec lesdits composés inhibiteurs de l'activation de NF- κ B dans le cadre de la présente invention, on peut citer :

- les cytokines,
- les anthracyclines, dont la daunomycine, la doxorubicine,
- les vinas-alcaloïdes, telles que la vinblastine et la vincristine,
- la paclitaxele (ou Taxol, DCI).

Avantageusement, le dosage des molécules cytotoxiques utilisées en association avec lesdits composés est environ 2 à environ 5 fois inférieur au dosage de ces mêmes molécules utilisées seules dans le cadre du traitement des hémopathies malignes et des tumeurs solides.

A titre d'illustration :

- la posologie journalière usuelle de la daunomycine ou la doxorubicine étant de 40 à 60 mg/m², la posologie de ces dernières dans le cadre la présente invention est d'environ 5 à 30 mg/m².

- la posologie journalière usuelle de la vinblastine étant de 5 à 7 mg/m², la posologie de cette dernière dans le cadre la présente invention est d'environ 1 à 4 mg/m²,

- la posologie journalière usuelle de la vincristine étant de 1 à 2 mg/m², la posologie de cette dernière dans le cadre la présente invention est d'environ 0,1 à 1 mg/m²,

- la posologie journalière usuelle du taxol étant d'environ 75 mg/m², la posologie de ce dernier dans le cadre la présente invention est d'environ 15 à 35 mg/m².

Parmi les cancers susceptibles d'être traités dans le cadre de la présente invention, on peut citer principalement :

- les hémopathies malignes telles que leucémies, lymphomes,
- les tumeurs solides telles que celles de l'ovaire, ou du sein.

L'invention a également pour objet tout produit contenant :

- un composé inhibiteur de l'activation de NF- κ B tel que décrit ci-dessus, et plus particulièrement un composé se liant spécifiquement aux récepteurs transmembranaires des cytokines de classe I tels que définis ci-dessus,
- et une molécule cytotoxique susceptible d'activer le facteur NF- κ B, en tant que préparation de combinaison pour une utilisation simultanée, séparée ou étalée dans le temps pour le traitement des hémopathies malignes et des tumeurs solides.

L'invention a également pour objet tout produit tel que défini ci-dessus, en tant que préparation de combinaison pour une utilisation simultanée, séparée ou étalée dans le temps pour la prévention de l'apparition, ou pour le traitement, de phénomènes de résistance aux molécules cytotoxiques utilisées dans le cadre du traitement des pathologies susmentionnées, apparaissant chez les patients traités par ces molécules lorsque ces dernières sont susceptibles d'activer NF- κ B.

L'invention concerne plus particulièrement tout produit tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce qu'il comprend à titre de composé inhibiteur de l'activation de NF- κ B, l'hormone de croissance, la prolactine, l'érythropoïétine, l'interleukine-4, l'interleukine-7, le G-CSF, le GM-CSF, l'interleukine-3, l'interleukine-6.

Des produits particulièrement préférés dans le cadre de la présente invention, sont ceux comprenant à titre de composé inhibiteur de l'activation de NF- κ B, l'hormone de croissance, ou l'érythropoïétine.

L'invention a plus particulièrement pour objet tout produit tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce qu'il comprend :

- l'hormone de croissance et la vincristine, dans des proportions telles que leur posologie journalière est d'environ 2 UI/kg d'hormone de croissance pour environ 0,1 à 1 mg/m² de vincristine,
- l'hormone de croissance et le taxol, dans des proportions telles que leur posologie journalière est d'environ 2 UI/kg d'hormone de croissance pour environ 15 à 35 mg/m² de taxol,
- l'érythropoïétine et la daunomycine ou la daunorubicine, dans des proportions telles que leur posologie journalière est d'environ 150 UI/kg d'érythropoïétine pour environ 5 à 30 mg/m² de daunomycine ou daunorubicine,
- l'érythropoïétine et la vinblastine, dans des proportions telles que leur posologie journalière est d'environ 150 UI/kg d'érythropoïétine pour environ 1 à 4 mg/m² de vinblastine,
- l'érythropoïétine et la vincristine, dans des proportions telles que leur posologie journalière est d'environ 150 UI/kg d'érythropoïétine pour environ 0,1 à 1 mg/m² de vincristine,
- l'érythropoïétine et le taxol, dans des proportions telles que leur posologie journalière est d'environ 150 UI/kg d'érythropoïétine pour environ 15 à 35 mg/m² de taxol.
- L'invention est illustrée à l'aide de la description détaillée qui suit de l'effet *in vitro* de l'hormone de croissance et de l'érythropoïétine sur des lignées cellulaires tumorales.

1) Exemple n°1 :

- Un gène de sélection (*neomycin resistant*, Neo^R) et le gène codant pour l'hormone de croissance humaine (hGH) ont été co-transfectés dans la lignée leucémique promyéloïde humaine U937. En comparant la lignée transfectée U937-hGH (qui produit de façon constitutive l'hGH à des doses physiologiques), soit à la lignée parentale U937, soit à une lignée transfectée avec Neo^R seul, on observe par différentes approches méthodologiques que la lignée U937-hGH tumeur davantage sous l'effet du *tumor necrosis factor* (TNF- α). Cette cytokine sécrétée par différents types de cellules immunes possède une activité antitumorale (Harakana, K et coll., 1984, Int J Cancer, 34:263-267) et est capable de promouvoir l'activation de NF- κ B (Baeuerle PA, Henkel T, 1994, Ann Rev Immunol, 12:141-179).
- Les cellules U937-hGH et les cellules contrôles U937-Neo ont été mises en culture pendant 48 heures en présence de concentrations croissantes de TNF- α

- l'hormone de croissance humaine telle qu'obtenue par extraction à partir d'extraits hypophysaires, et purification,
- ou, avantageusement, l'hormone de croissance humaine recombinante telle que décrite ci-dessus, codée par la séquence nucléotidique SEQ ID NO 1, ou par toute séquence nucléotidique dérivée de cette dernière par dégénérescence du code génétique et étant néanmoins capable de coder pour l'hormone de croissance humaine dont la séquence en acides aminés est représentée par SEQ ID NO 2, ou toute séquence peptidique dérivée par addition et/ou suppression et/ou substitution d'un ou plusieurs acides aminés de la séquence SEQ ID NO 2, et conservant la propriété de l'hormone de croissance humaine d'inhiber l'activation de NF- κ B.

L'invention a également pour objet tout produit tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce qu'il comprend de l'érythropoïétine humaine recombinante telle que décrite ci-dessus, codée par la séquence nucléotidique SEQ ID NO 3, ou par toute séquence nucléotidique dérivée de cette dernière par dégénérescence du code génétique et étant néanmoins capable de coder pour l'érythropoïétine humaine dont la séquence en acides aminés est représentée par SEQ ID NO 4, ou toute séquence peptidique dérivée par addition et/ou suppression et/ou substitution d'un ou plusieurs acides aminés de la séquence SEQ ID NO 4, et conservant la propriété de l'érythropoïétine humaine d'inhiber l'activation de NF- κ B.

L'invention concerne également tout produit tel que décrit ci-dessus, caractérisé en ce qu'il comprend à titre de molécule cytotoxique susceptible d'activer le facteur NF- κ B, toute molécule choisie parmi les suivantes :

- les cytokines,
 - les anthracyclines, dont la daunomycine, la daunorubicine,
 - les vinca-alcaloïdes, telles que la vinblastine et la vincristine,
 - la paclitaxèle (ou Taxol, DCI).
- Des produits tels que définis ci-dessus préférés dans le cadre de la présente invention, sont caractérisés en ce qu'ils contiennent :
- l'hormone de croissance et la daunomycine ou la daunorubicine, dans des proportions telles que leur posologie journalière est d'environ 2 UI/kg d'hormone de croissance pour environ 5 à 30 mg/m² de daunomycine ou daunorubicine,
 - l'hormone de croissance et la vinblastine, dans des proportions telles que leur posologie journalière est d'environ 2 UI/kg d'hormone de croissance pour environ 1 à 4 mg/m² de vinblastine,

recombinant. A l'issue de cette culture, les cellules lavées ont été incubées en présence d'iode de propidium qui s'incorpore dans l'ADN des cellules mortes. Les cellules sont analysées par cytométrie en flux.

La Figure n°1 montre l'augmentation de l'incorporation d'iode de propidium en fonction des doses croissantes de TNF- α exprimées en unités internationales (UI). Pour les cellules U937 (lignée "mère" ayant servi à obtenir les lignées U937-hGH), avec l'augmentation de la concentration de TNF- α on observe une légère augmentation du pourcentage de cellules fluorescentes (donc mortes) due à l'incorporation d'iode de propidium (fluorescence rouge). Cette figure met par contre bien en évidence le fait que ces valeurs sont beaucoup plus élevées pour la lignée U937-hGH, en fonction des doses croissantes de TNF- α ajoutées au milieu de culture.

Il est ainsi démontré que la présence dans les cultures cellulaires d'hGH produite par les lignées U937 transfectées avec le gène de l'hGH, augmente leur susceptibilité à l'induction de mort médiée par le TNF- α .

2) Exemple n°2 :

Ayant rapporté dans une étude précédente que l'hGH pouvait intervenir dans l'inhibition de l'activation de NF- κ B médiée par les lipopolysaccharides (Haefliger A et coll., 1997, J Immunol, 158:1310-1314), les Inventeurs ont étudié le statut de NF- κ B lors de la stimulation des différentes lignées par le TNF- α .

La Figure n°2 représente le résultat d'une analyse par gel retard. Sur ce gel ont été déposés des extraits nucléaires provenant des cellules U937-hGH et U937 (lignée "mère" ayant servi à obtenir les lignées U937-hGH) soumises à différents inducteurs dont le TNF- α ou le TNF- α et la cycloheximide (inhibiteur de synthèse protéique). Cette expérience indique clairement que la présence de NF- κ B dans les noyaux des cellules U937-hGH est diminuée par rapport aux cellules contrôles.

La présence de NF- κ B est attestée sur les lignes 4 et 5 qui représentent la migration des extraits nucléaires de cellules U937 stimulées par le TNF- α , et pré-incubées, soit avec une sonde froide NF- κ B mutée qui ne déplace pas le signal (ligne 4), soit avec une sonde froide NF- κ B homologue qui inhibe le signal (ligne 5).

La Figure n°3 représente le résultat d'un enzyme immunoassay (ELISA) réalisé avec le lysat de cellules U937-hGH et U937-Neo transfectées de façon

transitoire avec un plasmide contenant des séquences NF- κ B dans le promoteur du gène rapporteur codant pour la chloramphenicol-acetyl-transférase (CAT) (Chiao P et coll., 1994, Proc Natl Acad Sci USA, 91:28-32).

Les cellules sont transfectées par électroporation puis incubées avec le TNF- α . A l'issue de la culture, les cellules sont lysées et l'activité CAT est mesurée par un ELISA commercial (Boehringer-Mannheim), selon les recommandations du fournisseur.

La figure montre que l'activité CAT, reflet de la présence de NF- κ B, est diminuée dans les cellules U937-hGH par rapport aux cellules contrôles, après stimulation par le TNF- α .

Les résultats présentés dans les Figures 2 et 3 démontrent donc par deux approches méthodologiques différentes, que la synthèse de NF- κ B est diminuée dans U937-hGH par rapport à la lignée contrôle.

3) Exemple n°3 :

L'utilisation du TNF- α étant très difficile en clinique humaine du fait des effets secondaires adverses, les Inventeurs se sont intéressés à la daunomycine. Cette anthracycline utilisée en thérapie anticancéreuse sous le nom de Cerubidine[®] agit en s'intercalant dans les séquences de l'ADN cellulaire, perturbant de ce fait le fonctionnement cellulaire. Tout comme le TNF- α (Baeuerle PA, Henkel T, 1994, Ann Rev Immunol, 12:141-179), la daunomycine active NF- κ B (Das KC, White CW, 1997, J Biol Chem, 272:14914-14920).

La Figure 4 indique que la lignée U937-hGH est également plus sensible que la lignée contrôle à la mort médiée par la daunomycine.

4) Exemple n°4 :

Pour tester la possibilité d'utiliser l'objet de la présente invention sur des tumeurs non lymphoïdes, les Inventeurs ont utilisé l'hGH pour essayer d'inverser le phénotype "adriamycine résistant" de cellules isolées à partir d'un adénocarcinome ovarien humain IGROV/ADR (Bénard J et coll., 1985, Cancer Res, 45:4970-4979).

Comme illustré par la Figure 5, ces cellules sont insensibles à l'effet toxique de la daunomycine ajoutée à la culture (groupes hGH 0 ng/ml). L'adjonction d'hGH recombinant (Salzen[®], laboratoire Serono) rend ces

Légendes des figures :

- Figure 1 : Effet de l'hormone de croissance sur la mortalité des cellules exposées au TNF- α : le pourcentage des cellules mortes (IP+) est indiqué en ordonnée, les colonnes blanches correspondant aux cellules de la souche U937-Neo, les colonnes noires correspondant aux cellules de la souche U937-hGH ; les concentrations de TNF- α sont indiquées en abscisse en UI/ml.

- Figure 2 : Effet de l'hormone de croissance sur la translocation de NF- κ B ; la colonne 1 correspond aux cellules U937 de contrôle, la colonne 2 correspond aux cellules U937 traitées par TNF- α + cycloheximide, la colonne 3 correspond aux cellules U937 traitées par TNF- α , la colonne 4 correspond aux cellules U937 traitées par TNF- α + une sonde NF- κ B mutée, la colonne 5 correspond aux cellules U937 traitées par TNF- α + une sonde NF- κ B homologue, la colonne 6 correspond aux cellules U937-hGH de contrôle, la colonne 7 correspond aux cellules U937-hGH traitées par TNF- α + cycloheximide, la colonne 8 correspond aux cellules U937-hGH traitées par TNF- α ; la présence de NF- κ B est indiquée par une flèche.

- Figure 3 : Effet de l'hormone de croissance sur l'activité rapporteur CAT ; le pourcentage de variation de l'activité CAT est indiqué en abscisse ; les deux colonnes de gauche représentent les deux expériences effectuées sur les cellules U937-Neo, et les deux colonnes de droite représentent les deux expériences indépendantes effectuées sur les cellules U937-hGH.

- Figure 4 : Effet de l'hormone de croissance sur l'apoptose induite par la daunomycine ; le pourcentage des cellules mortes (IP+) est indiqué en ordonnée, les colonnes blanches correspondant aux cellules de la souche U937-Neo, les colonnes noires correspondant aux cellules de la souche U937-hGH ; les pourcentages indiqués montrent l'augmentation de la mortalité des cellules ; les concentrations de daunomycine sont indiquées en abscisse en μ M.

- Figure 5 : Effet de l'hormone de croissance sur l'apoptose de la lignée IGROV/ADR, induite par la daunomycine ; le pourcentage des cellules mortes (IP+) est indiqué en ordonnée, les différentes colonnes correspondant aux différentes concentrations d'hGH utilisées (0, 5, 50, 500, 1000 ng/ml) ; les concentrations de daunomycine sont indiquées en abscisse en μ M.

cellules sensibles à la daunomycine, avec un effet maximal observé pour la plus faible dose d'hGH utilisée ici, soit 5 ng/ml.

Ce résultat prouve d'une part que des résulats d'aggravation de mortalité peuvent être obtenus aussi bien avec de l'hGH exogène recombinant qu'avec les lignées transfectées ausmentionnées, et que d'autre part, la présente invention peut s'appliquer à des tumeurs solides non lymphoïdes.

5) Exemple n°5 :

L'érythropoétine (EPO), une autre molécule que hGH appartenant à la même famille des cytokines de classe I, a été testée sur des cellules de carcinome rénal humain (RCC) HIEG.

4.10⁴ cellules RCC ont été transfectées de façon transitoire à l'aide d'un kit Effectect[®], soit avec 3 μ g d'un plasmide portant le gène codant pour EPO (cellules RCC-EPO), soit avec 3 μ g d'un plasmide codant pour la résistance à la néomycine (cellules RCC-Neo) comme contrôle négatif. 48 heures après, les RCC ont été mises en présence de daunomycine à deux concentrations différentes : 0,3 et 0,6 μ M. Le nombre de cellules survivantes a été mesuré 48 heures plus tard par cytométrie en flux (Figure 6).

Les résultats de l'expérience 1 exprimés en nombre de cellules vivantes sont les suivants :

	RCC-Neo	RCC-EPO
daunomycine 0 μ M	14745	26911
daunomycine 0,3 μ M	11382	3487
daunomycine 0,6 μ M	10179	8551

Les résultats de l'expérience 2 exprimés en nombre de cellules vivantes sont les suivants :

	RCC-Neo	RCC-EPO
daunomycine 0 μ M	20150	29102
daunomycine 0,3 μ M	8891	2693
daunomycine 0,6 μ M	7001	4739

Les résultats montrent que dans deux expériences différentes (expériences 1 et 2), la présence conjointe de daunomycine et d'EPO aggrave sensiblement la mortalité cellulaire, avec un effet plus marqué pour la plus faible dose de daunomycine utilisée.

- Figure 6 : Effet de l'érythropoïétine sur l'apoptose de la lignée de carcinome rénal humain HIEG, induite par la daunomycine : pour chacune des expériences 1 et 2, le nombre de cellules vivantes est indiqué en ordonnée, les colonnes blanches correspondant aux cellules RCC-Neo, les colonnes noires correspondant aux cellules RCC-EPO ; les concentrations de daunomycine sont indiquées en abscisse en μM .

5

REVENDICATIONS

1. Utilisation de composés inhibiteurs de l'activation du facteur nucléaire κB (NF- κB), pour la préparation de médicaments destinés au traitement des hémopathies malignes et des tumeurs solides, et à la prévention de l'apparition, ou au traitement, de phénomènes de résistance aux molécules cytotoxiques utilisées dans le cadre du traitement des pathologies susmentionnées, apparaissant chez les patients traités par ces molécules lorsque ces dernières sont susceptibles d'activer NF- κB .

10

2. Utilisation de composés inhibiteurs de l'activation de NF- κB selon la revendication 1, pour la préparation de médicaments destinés au traitement des hémopathies malignes et des tumeurs solides, en association avec une ou plusieurs molécules cytotoxiques utilisables dans le cadre du traitement des pathologies susmentionnées et susceptibles d'activer le facteur NF- κB .

15

3. Utilisation selon la revendication 1 ou la revendication 2, de composés inhibiteurs de l'activation de NF- κB se liant spécifiquement aux récepteurs transmembranaires des cytokines de classe I dans les cellules de l'organisme, tels que les composés choisis parmi l'hormone de croissance ou l'érythropoïétine.

20

4. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 3 :

25

- de l'hormone de croissance humaine, telle qu'obtenue par extraction à partir d'extraits hypophysaires, et purification,

- ou de l'hormone de croissance humaine recombinante telle que codée par la séquence nucléotidique SEQ ID NO 1, ou par toute séquence nucléotidique dérivée de cette dernière par dégénérescence du code génétique et étant néanmoins capable de coder pour l'hormone de croissance humaine dont la séquence en acides aminés est représentée par SEQ ID NO 2, ladite hormone de croissance étant obtenue par transformation de cellules appropriées à l'aide de vecteurs contenant une séquence nucléotidique telle que décrite ci-dessus, récupération de la protéine recombinante produite par lesdites cellules, et purification,

30

- ou de toute séquence peptidique dérivée par addition et/ou suppression et/ou substitution d'un ou plusieurs acides aminés de la séquence SEQ ID NO 2,

35

9. Produit selon la revendication 8, caractérisé en ce qu'il comprend à titre de composé inhibiteur de l'activation de NF- κ B, un composé se liant spécifiquement aux récepteurs transmembranaires des cytokines de classe I dans les cellules de l'organisme, choisi notamment parmi l'hormone de croissance ou l'érythropoïétine.

10. Produit selon la revendication 8 ou 9, caractérisé en ce qu'il comprend:

- l'hormone de croissance humaine, telle qu'obtenue par extraction à partir d'extraits hypophysaires, et purification,
- ou l'hormone de croissance humaine recombinante telle que codée par la séquence nucléotidique SEQ ID NO 1, ou par toute séquence nucléotidique dérivée de cette dernière par dégénérescence du code génétique et étant néanmoins capable de coder pour l'hormone de croissance humaine dont la séquence en acides aminés est représentée par SEQ ID NO 2, ladite hormone de croissance étant obtenue par transformation de cellules appropriées à l'aide de vecteurs contenant une séquence nucléotidique telle que décrite ci-dessus, récupération de la protéine recombinante produite par lesdites cellules, et purification,
- ou toute séquence peptidique dérivée par addition et/ou suppression et/ou substitution d'un ou plusieurs acides aminés de la séquence SEQ ID NO 2, et conservant la propriété de l'hormone de croissance humaine d'inhiber l'activation de NF- κ B.

11. Produit selon la revendication 8 ou 9, caractérisé en ce qu'il comprend:

- l'érythropoïétine humaine recombinante telle que codée par la séquence nucléotidique SEQ ID NO 3, ou par toute séquence nucléotidique dérivée de cette dernière par dégénérescence du code génétique et étant néanmoins capable de coder pour l'érythropoïétine humaine dont la séquence en acides aminés est représentée par SEQ ID NO 4, ladite érythropoïétine étant obtenue par transformation de cellules appropriées à l'aide de vecteurs contenant une séquence nucléotidique telle que décrite ci-dessus, récupération de la protéine recombinante produite par lesdites cellules, et purification.

- ou toute séquence peptidique dérivée par addition et/ou suppression et/ou substitution d'un ou plusieurs acides aminés de la séquence SEQ ID NO 4,

et conservant la propriété de l'hormone de croissance humaine d'inhiber l'activation de NF- κ B.

5. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 3 :

- de l'érythropoïétine humaine recombinante telle que codée par la séquence nucléotidique SEQ ID NO 3, ou par toute séquence nucléotidique dérivée de cette dernière par dégénérescence du code génétique et étant néanmoins capable de coder pour l'érythropoïétine humaine dont la séquence en acides aminés est représentée par SEQ ID NO 4, ladite érythropoïétine étant obtenue par transformation de cellules appropriées à l'aide de vecteurs contenant une séquence nucléotidique telle que décrite ci-dessus, récupération de la protéine recombinante produite par lesdites cellules, et purification.

- ou de toute séquence peptidique dérivée par addition et/ou suppression et/ou substitution d'un ou plusieurs acides aminés de la séquence SEQ ID NO 4, et conservant la propriété de l'érythropoïétine humaine d'inhiber l'activation de NF- κ B.

6. Utilisation de composés inhibiteurs de l'activation de NF- κ B selon l'une des revendications 1 à 7, en association avec une ou plusieurs molécules cytotoxiques susceptibles d'activer le facteur NF- κ B choisies parmi :

- les cytokines,
- les anthracyclines, dont la daunomycine, la doxorubicine,
- les vincas-alcaloïdes, telles que la vinblastine et la vincristine,
- la paclitaxele (ou Taxol, DCI).

7. Utilisation de composés inhibiteurs de l'activation de NF- κ B selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que le dosage des molécules cytotoxiques utilisées en association avec lesdits composés est environ 2 à environ 5 fois inférieur au dosage de ces mêmes molécules utilisées seules dans le cadre du traitement des hémopathies malignes et des tumeurs solides.

8. Produits contenant un composé inhibiteur de l'activation de NF- κ B et une molécule cytotoxique susceptible d'activer le facteur NF- κ B, en tant que préparation de combinaison pour une utilisation simultanée, séparée ou étalée dans le temps pour le traitement des hémopathies malignes et des tumeurs solides.

et conservant la propriété de l'érythropoïétine humaine d'inhiber l'activation de NF- κ B.

12. Produit selon l'une des revendications 8 à 11, caractérisé en ce qu'il comprend à titre de molécule cytotoxique susceptible d'activer le facteur NF- κ B, toute molécule choisie parmi les suivantes :
- les cytokines,
 - les anthracyclines, dont la daunomycine, la doxorubicine,
 - les vinca-alcaloïdes, telles que la vinblastine et la vincristine,
 - la paclitaxele (ou Taxol, DCI).

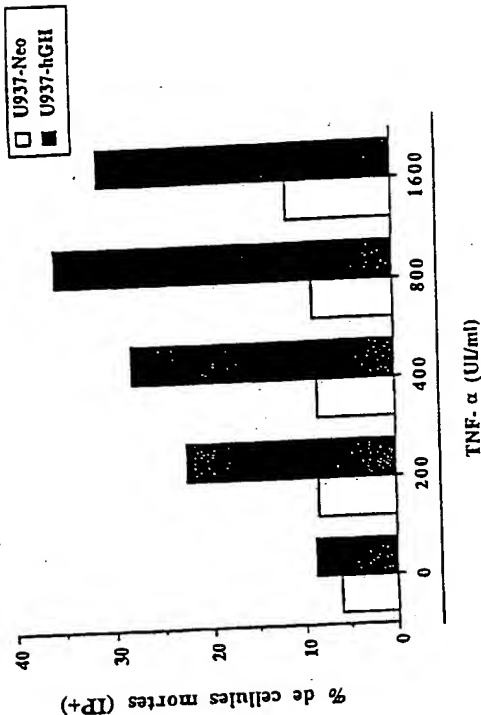


FIGURE 1

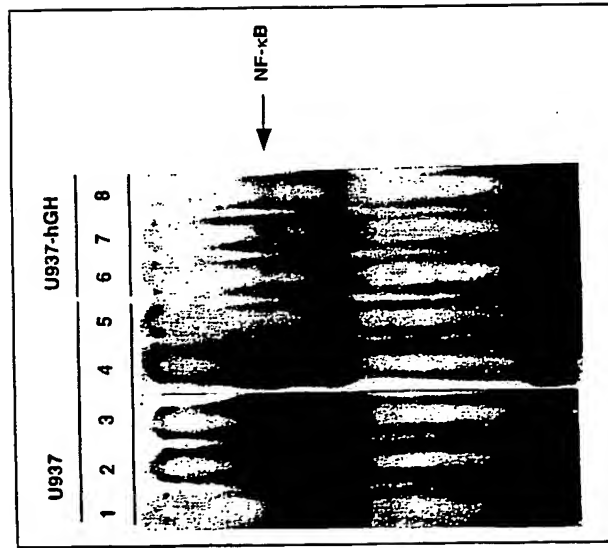


FIGURE 2

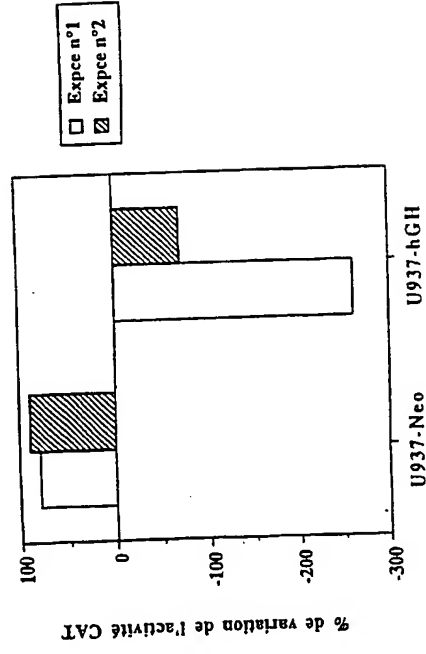


FIGURE 3

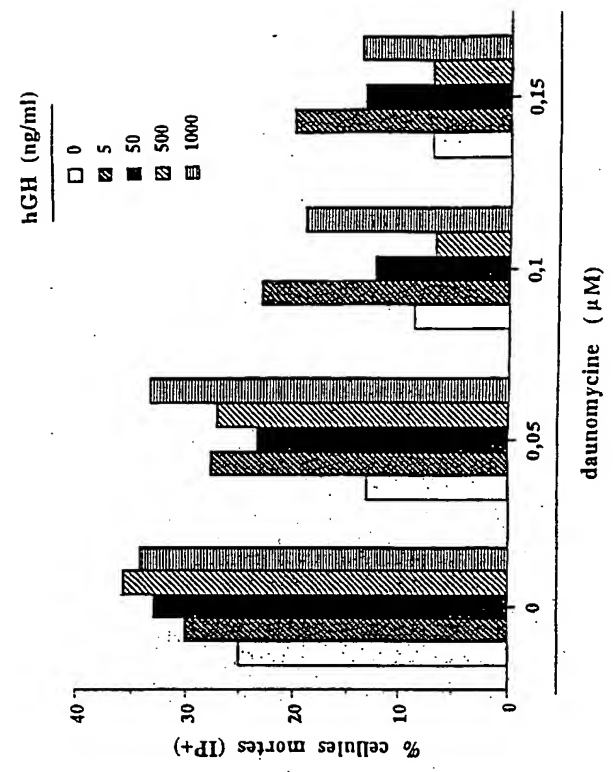


FIGURE 5

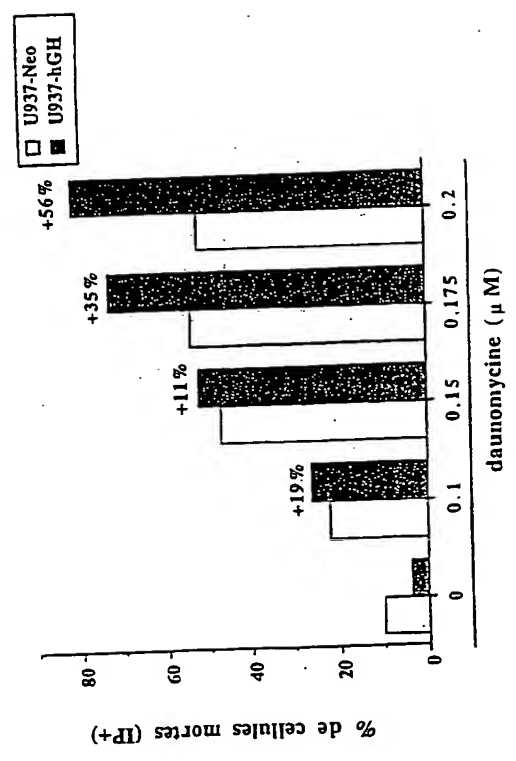
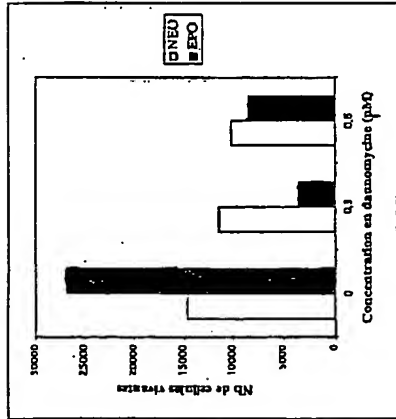


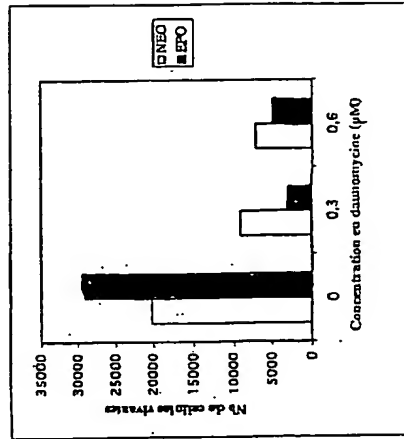
FIGURE 4

Figure 6

Expérience 1



Expérience 2



LISTE DE SEQUENCES

5 (1) INFORMATIONS GENERALES:

(i) DEPOSANT:

- (A) NOM: CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
- (B) RUE: 3, rue Michel-Ange
- (C) VILLE: PARIS
- (E) PAYS: FRANCE
- (F) CODE POSTAL: 75794 CEDEX 16

10

- (ii) TITRE DE L' INVENTION: INHIBITEURS DE L'ACTIVATION DE NF-KB, ET LEURS UTILISATIONS PHARMACOLOGIQUES

15

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 4

(iv) FORME DECHIFFRABLE PAR ORDINATEUR:

- (A) TYPE DE SUPPORT: Floppy disk
- (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
- (C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
- (D) LOGICIEL: Patentin Release #1.0, Version #1.30 (OSB)

20

25 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 609 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: double
- (D) CONFIGURATION: linéaire

30

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

35

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLB: CDS
- (B) EMPLACEMENT: 1..609

40

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

ATG GCT ACA GGC TCC CGG ACG TCC CTG CTC CTG OCT TTT GGC CTG CTC
45 Met Ala Thr Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Ala Phe Gly Leu Leu
1 5 10 15

48

TGC CTG CCC TGG CTT CAA GAG GGC AGT GCC TTC CCA ACC ATT CCC TTA
Cys Leu Pro Tip Leu Gln Gly Ser Ala Phe Pro Thr Ile Pro Leu
20 25 30

96

TCC AGG CTT TTT GAC AAC OCT AGT CTC CGC GGC CAT COT CTG CAC CAG
Ser Arg Leu Phe Asp Asn Ala Ser Leu Arg Ala His Arg Leu His Gln
35 40 45

144

55

		(B) TYPE, acide aminé		(D) CONFIGURATION: linéaire	
		(11) TYPE DE MOLECULE: protéine		(12) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE, SEQ ID NO: 4:	
5	Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Ser Leu	1	5	10	15
10	Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu	20	25	30	35
15	Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu	40	45	50	55
20	Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu	60	65	70	75
25	Met Glu Val Gly Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu	80	85	90	95
30	Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly	100	105	110	115
35	Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu	120	125	130	135
40	Arg Gly Lys Leu Lys Leu Thr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp	140	145	150	155
45	Arg	160	165	170	175
50	Arg	180	185	190	195
55	Arg	200	205	210	215
60	Arg	215	220	225	230
65	Arg	235	240	245	250
70	Arg	255	260	265	270
75	Arg	275	280	285	290
80	Arg	295	300	305	310
85	Arg	315	320	325	330
90	Arg	335	340	345	350
95	Arg	355	360	365	370
100	Arg	375	380	385	390
105	Arg	395	400	405	410
110	Arg	415	420	425	430
115	Arg	435	440	445	450
120	Arg	455	460	465	470
125	Arg	475	480	485	490
130	Arg	495	500	505	510
135	Arg	515	520	525	530
140	Arg	535	540	545	550
145	Arg	555	560	565	570
150	Arg	575	580	585	590
155	Arg	595	600	605	610
160	Arg	615	620	625	630
165	Arg	635	640	645	650
170	Arg	655	660	665	670
175	Arg	675	680	685	690
180	Arg	695	700	705	710
185	Arg	715	720	725	730
190	Arg	735	740	745	750
195	Arg	755	760	765	770
200	Arg	775	780	785	790
205	Arg	795	800	805	810
210	Arg	815	820	825	830
215	Arg	835	840	845	850
220	Arg	855	860	865	870
225	Arg	875	880	885	890
230	Arg	895	900	905	910
235	Arg	915	920	925	930
240	Arg	935	940	945	950
245	Arg	955	960	965	970
250	Arg	975	980	985	990
255	Arg	995	1000	1005	1010
260	Arg	1015	1020	1025	1030
265	Arg	1035	1040	1045	1050
270	Arg	1055	1060	1065	1070
275	Arg	1075	1080	1085	1090
280	Arg	1095	1100	1105	1110
285	Arg	1115	1120	1125	1130
290	Arg	1135	1140	1145	1150
295	Arg	1155	1160	1165	1170
300	Arg	1175	1180	1185	1190
305	Arg	1195	1200	1205	1210
310	Arg	1215	1220	1225	1230
315	Arg	1235	1240	1245	1250
320	Arg	1255	1260	1265	1270
325	Arg	1275	1280	1285	1290
330	Arg	1295	1300	1305	1310
335	Arg	1315	1320	1325	1330
340	Arg	1335	1340	1345	1350
345	Arg	1355	1360	1365	1370
350	Arg	1375	1380	1385	1390
355	Arg	1395	1400	1405	1410
360	Arg	1415	1420	1425	1430
365	Arg	1435	1440	1445	1450
370	Arg	1455	1460	1465	1470
375	Arg	1475	1480	1485	1490
380	Arg	1495	1500	1505	1510
385	Arg	1515	1520	1525	1530
390	Arg	1535	1540	1545	1550
395	Arg	1555	1560	1565	1570
400	Arg	1575	1580	1585	1590
405	Arg	1595	1600	1605	1610
410	Arg	1615	1620	1625	1630
415	Arg	1635	1640	1645	1650
420	Arg	1655	1660	1665	1670
425	Arg	1675	1680	1685	1690
430	Arg	1695	1700	1705	1710
435	Arg	1715	1720	1725	1730
440	Arg	1735	1740	1745	1750
445	Arg	1755	1760	1765	1770
450	Arg	1775	1780	1785	1790
455	Arg	1795	1800	1805	1810
460	Arg	1815	1820	1825	1830
465	Arg	1835	1840	1845	1850
470	Arg	1855	1860	1865	1870
475	Arg	1875	1880	1885	1890
480	Arg	1895	1900	1905	1910
485	Arg	1915	1920	1925	1930
490	Arg	1935	1940	1945	1950
495	Arg	1955	1960	1965	1970
500	Arg	1975	1980	1985	1990
505	Arg	1995	2000	2005	2010
510	Arg	2015	2020	2025	2030
515	Arg	2035	2040	2045	2050
520	Arg	2055	2060	2065	2070
525	Arg	2075	2080	2085	2090
530	Arg	2095	2100	2105	2110
535	Arg	2115	2120	2125	2130
540	Arg	2135	2140	2145	2150
545	Arg	2155	2160	2165	2170
550	Arg	2175	2180	2185	2190
555	Arg	2195	2200	2205	2210
560	Arg	2215	2220	2225	2230
565	Arg	2235	2240	2245	2250
570	Arg	2255	2260	2265	2270
575	Arg	2275	2280	2285	2290
580	Arg	2295	2300	2305	2310
585	Arg	2315	2320	2325	2330
590	Arg	2335	2340	2345	2350
595	Arg	2355	2360	2365	2370
600	Arg	2375	2380	2385	2390
605	Arg	2395	2400	2405	2410
610	Arg	2415	2420	2425	2430
615	Arg	2435	2440	2445	2450
620	Arg	2455	2460	2465	2470
625	Arg	2475	2480	2485	2490
630	Arg	2495	2500	2505	2510
635	Arg	2515	2520	2525	2530
640	Arg	2535	2540	2545	2550
645	Arg	2555	2560	2565	2570
650	Arg	2575	2580	2585	2590
655	Arg	2595	2600	2605	2610
660	Arg	2615	2620	2625	2630
665	Arg	2635	2640	2645	2650
670	Arg	2655	2660	2665	2670
675	Arg	2675	2680	2685	2690
680	Arg	2695	2700	2705	2710
685	Arg	2715	2720	2725	2730
690	Arg	2735	2740	2745	2750
695	Arg	2755	2760	2765	2770
700	Arg	2775	2780	2785	2790
705	Arg	2795	2800	2805	2810
710	Arg	2815	2820	2825	2830
715	Arg	2835	2840	2845	2850
720	Arg	2855	2860	2865	2870
725	Arg	2875	2880	2885	2890
730	Arg	2895	2900	2905	2910
735	Arg	2915	2920	2925	2930
740	Arg	2935	2940	2945	2950
745	Arg	2955	2960	2965	2970
750	Arg	2975	2980	2985	2990
755	Arg	2995	3000	3005	3010
760	Arg	3015	3020	3025	3030
765	Arg	3035	3040	3045	3050
770	Arg	3055	3060	3065	3070
775	Arg	3075	3080	3085	3090
780	Arg	3095	3100	3105	3110
785	Arg	3115	3120	3125	3130
790	Arg	3135	3140	3145	3150
795	Arg	3155	3160	3165	3170
800	Arg	3175	3180	3185	3190
805	Arg	3195	3200	3205	3210
810	Arg	3215	3220	3225	3230
815	Arg	3235	3240	3245	3250
820	Arg	3255	3260	3265	3270
825	Arg	3275	3280	3285	3290
830	Arg	3295	3300	3305	3310
835	Arg	3315	3320	3325	3330
840	Arg	3335	3340	3345	3350
845	Arg	3355	3360	3365	3370
850	Arg	3375	3380	3385	3390
855	Arg	3395	3400	3405	3410
860	Arg	3415	3420	3425	3430
865	Arg	3435	3440	3445	3450
870	Arg	3455	3460	3465	3470
875	Arg	3475	3480	3485	3490
880	Arg	3495	3500	3505	3510
885	Arg	3515	3520	3525	3530
890	Arg	3535	3540	3545	3550
895	Arg	3555	3560	3565	3570
900	Arg	3575	3580	3585	3590
905	Arg	3595	3600	3605	3610
910	Arg	3615	3620	3625	3630
915	Arg	3635	3640	3645	3650
920	Arg	3655	3660	3665	3670
925	Arg	3675	3680	3685	3690
930	Arg	3695	3700	3705	3710
935	Arg	3715	3720	3725	3730
940	Arg	3735	3740	3745	3750
945	Arg	3755	3760	3765	3770
950	Arg	3775	3780	3785	3790
955	Arg	3795	3800	3805	3810
960	Arg	3815	3820	3825	3830
965	Arg	3835	3840	3845	3850
970	Arg	3855	3860	3865	3870
975	Arg	3875	3880	3885	3890
980	Arg	3895	3900	3905	3910
985	Arg	3915	3920	3925	3930
990	Arg	3935	3940	3945	3950
995	Arg	3955	3960	3965	3970
1000	Arg	3975	3980	3985	3990

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 4:

(1) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 194 acides aminés

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.